



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

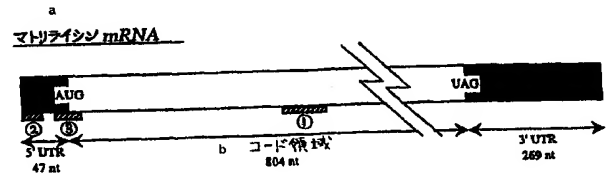
(51) 国際特許分類6 C12N 15/11, A61K 31/70, 48/00		A1	(11) 国際公開番号 WO99/28452
			(43) 国際公開日 1999年6月10日(10.06.99)
(21) 国際出願番号 PCT/JP98/02327		(81) 指定国 CA, JP, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(22) 国際出願日 1998年5月27日(27.05.98)		添付公開書類 国際調査報告書 不利にならない開示又は発明の新規性の喪失の例外に関する陳述	
(30) 優先権データ 特願平9/343784 1997年11月28日(28.11.97)		JP	
(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 持田製薬株式会社 (MOCHIDA PHARMACEUTICAL CO., LTD.)[JP/JP] 〒160-0004 東京都新宿区四谷一丁目7番地 Tokyo, (JP)			
(72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 宮崎 香(MIYAZAKI, Kaoru)[JP/JP] 〒251-0861 神奈川県藤沢市大庭5683番地2号 Kanagawa, (JP)			
(74) 代理人 弁理士 阿部正博(ABE, Masahiro) 〒274-0825 千葉県船橋市前原西二丁目14番1号 ダイアパレス津田沼317号 Chiba, (JP)			

(54)Title: MATRILYSIN ANTISENSE COMPOUNDS

(54)発明の名称 マトリライシンアンチセンス化合物

(57) Abstract

Substances capable of specifically inhibiting the expression of matrilysin to thereby inhibit metastasis and prepared by utilizing the antisense technique. Antisense compounds hybridizable with at least a part of a partial sequence of a gene encoding human matrilysin; and medicinal compositions, in particular ones having the effect of inhibiting metastasis, containing these antisense compounds.



c コア領域 (配列番号1)
TCC AAA GTG GTC ACC TAC AGG ATC GTA TCA TAT ACT CGA GAC
TTA CCG CAT ATT A

d キャップ形成部位 (配列番号2)
AAA TCA ACC ATA GGT CCA AGA

e AUG近傍 (配列番号3)
TCT GGA CGG CAG CTA TGC GAC TCA CCG TGC TGT GTG

f AS-1 (配列番号4)
GTATATGATACGATC

- a ... Matrilysin mRNA
- b ... Coding region
- c ... Core region (SEQ ID NO:1)
- d ... Capping site (SEQ ID NO:2)
- e ... Vicinity of AUG (SEQ ID NO:3)
- f ... AS-1 (SEQ ID NO:4)

(57)要約

本発明の目的は、アンチセンス技術を利用して、マトリライシンの発現を特異的に抑制し、がんに対する転移抑制活性を有するような物質を提供することである。

本発明は、ヒトマトリライシンをコードする遺伝子の部分配列の少なくとも一部にハイブリダイズするようなアンチセンス化合物、該部分配列に相補的な配列を有するアンチセンス化合物、及びこれらのアンチセンス化合物を含んで成る医薬組成物、特に、がん転移抑制効果を有する医薬組成物に関する。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SG	シンガポール
AL	アルバニア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SI	スロヴェニア
AM	アルメニア	FR	フランス	LR	リベリア	SK	スロヴァキア
AT	オーストリア	GA	ガボン	LS	レソト	SL	シエラ・レオネ
AU	オーストラリア	GB	英国	LT	リトアニア	SN	セネガル
AZ	アゼルバイジャン	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SZ	スワジランド
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	TD	チャード
BB	バルバドス	GH	ガーナ	MC	モナコ	TG	トーゴ
BE	ベルギー	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BF	ブルキナ・ファソ	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BG	ブルガリア	GW	ギニア・ビサウ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR	トルコ
BJ	ベナン	GR	ギリシャ		共和国	TT	トリニダード・トバゴ
BR	ブラジル	HR	クロアチア	ML	マリ	UA	ウクライナ
BY	ベラルーシ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	UG	ウガンダ
CA	カナダ	ID	インドネシア	MR	モーリタニア	US	米国
CF	中央アフリカ	IE	アイルランド	MW	マラウイ	UZ	ウズベキスタン
CG	コンゴ	IL	イスラエル	MX	メキシコ	VN	ヴェトナム
CH	スイス	IN	インド	NE	ニジェール	YU	ユーゴスラビア
CI	コートジボアール	IS	アイスランド	NL	オランダ	ZA	南アフリカ共和国
CM	カメルーン	IT	イタリア	NO	ノールウェー	ZW	ジンバブエ
CN	中国	JP	日本	NZ	ニュージーランド		
CU	キューバ	KE	ケニア	PL	ポーランド		
CY	キプロス	KG	キルギスタン	PT	ポルトガル		
CZ	チェッコ	KP	北朝鮮	RO	ルーマニア		
DE	ドイツ	KR	韓国	RU	ロシア		
DK	デンマーク	KZ	カザフスタン	SD	スーダン		
EE	エストニア	LC	セントルシア	SE	スウェーデン		

明細書

マトリライシンアンチセンス化合物

技術分野

本発明は、ヒトマトリライシンをコードする遺伝子の一部とハイブリダイズするか、又はそれに相補的な配列を含むアンチセンス化合物に関する。さらに、該アンチセンス化合物および薬学的に許容しうる担体を含む医薬組成物に関する。

背景技術

宮崎香 等、生化学、第68巻、1791-1807頁、(1996) には、「マトリックス・メタロプロテアーゼの構造と機能—特にがんの浸潤・転移における役割」と題して、マトリックス・メタロプロテアーゼに関する総説が記載されている。

マトリックス・メタロプロテアーゼ(MMP)は細胞外マトリックスタンパク質を主要な基質とする一群の金属要求性プロテアーゼの総称であり、代表的なMMPとしては、コラゲナーゼ群として間質型コラゲナーゼ(MMP-1)、好中球コラゲナーゼ(MMP-8)、コラゲナーゼ-3(MMP-13)、ゼラチナーゼ群としてゼラチナーゼA(MMP-2)、ゼラチナーゼB(MMP-9)、ストロムライシン群として、ストロムライシン1(MMP-3)、ストロムライシン2(MMP-10)、MT-MMP群としてMT1-MMP(MMP-14)、MT2-MMP(MMP-15)、MT3-MMP(MMP-16)、MT

4-MMP (MMP-17)、その他のMMPとしてマトリライシン (MMP-7)、ストロムライシン3 (MMP-11)、メタロエラスターゼ (MMP-12) が知られている。

これまでの研究によれば、種々のがん細胞における転移性や浸潤能とMMP産生能の間には相関関係が見られ、がんの浸潤・転移におけるMMPの役割を示唆している。

例えば、今井一志 蛋白核酸酵素、第42巻、1694-1700頁、(1997) には、がん細胞の浸潤・転移に伴うECM (細胞外マトリックス) 破壊には、細胞周囲のECM破壊が必要であり、なかでも細胞膜貫通型MMP (MT-MMP) とMMP-2 (ゼラチナーゼA) の果たす役割が大きいことが述べられている。

又、岡田明子等、蛋白核酸酵素、第42巻、2386-2392頁、(1997) によれば、ヒドロキサメート誘導体のバチマスタットやマリマスタットはマトリックス・メタロプロテアーゼに対してスペクトラムの広い強力なインヒビターであり、マウスの移植大腸がんなどの増殖を抑制し転移も抑制すると示されている。

さらに、マトリックス・メタロプロテアーゼ阻害活性を有するクロモン誘導体がマウス黒色種の増殖抑制作用を示したことも開示されている (特開平9-110864)。

さて、MMPの一種であるマトリライシンの分子量は28Kと他のMMPに比べ小さい。又、他のMMPが持つヘモペキシン様C末端ドメインをマトリライシンは持っていない。

マトリライシンはフィブロネクチン、ラミニン及びIV型コラーゲン等の種々のECMに対してプロテアーゼ活性を有している。

マトリライシンの天然型酵素はヒト直腸がん細胞の培養液からマトリンの名称で初めて精製された (Miyazaki, K., Hattori, Y., Umenishi, F., Yasumitsu, H., & Umeda, M., *Cancer Res.* 50, 7758-7764 (1990))。

マトリライシンは大腸がん、前立腺がん、脳腫瘍、リンフォーマのがん組織で発現していることがこれまでの研究で確認されており、特に、大腸がんではほとんど例外なしに発現が見られる。更に、ストロムライシン類やコラゲナーゼ類はがん組織周辺の間質細胞で発現が亢進するのに対して、マトリライシンはがん組織自身に特異的な発現が見られる (宮崎香 等、生化学、第68巻、1791-1807頁、(1996))。

又、マトリライシン cDNA 構築物のヒト前立腺がん細胞株 DU-145 に於ける過剰発現によって、マウスに於ける該細胞の浸潤能が増大したことが報告されている (Powell WC, Knox JD, Narve M et al., *Cancer Res.* 53, 417-722 (1993))。

更に、Apc 遺伝子に変異が入っているため小腸に腫瘍が多数出現するコンジェニックマウスのマトリライシンを相同組み換えで欠損させたものは、その腫瘍の数が著しく減少したという報告がなされた (Wilson, C. L. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 1402-1407 (1997))。

尚、ヒトのマトリライシン cDNA 配列は、Muller, D., Breathnach, R. et al. *Biochem. J.* 253, 187-192 (1988)、および、Marti, H-P., Malcolm, D. Lovett, D. H. et al., *Biochem. J.* 285, 899-905 (1992) に p u m p - 1 の名称で開示されている。

また、Gaire, M., Magbanua, Z., McDonnel, S., et al., J. Biol. Chem., 269, 2032-2040 (1994) にそのゲノムの配列が開示されている。

一方、マトリライシンの cDNA 全長を逆方向に組み込んだベクターを作成し、これを大腸がん細胞株に導入して、がんの転移と浸潤におけるマトリライシンの役割について検討された。インビトロ試験によるベクターを組み込んだ大腸がん細胞の浸潤能試験では、マトリライシンの発現と進入速度（浸潤）に明確な関連が認められていない。インビボ試験においてベクターを組み込んだ大腸がん細胞をヌードマウス盲腸へ接種し肝転移を観察したところ、ベクターの導入により腫瘍形成能が減少し、腫瘍形成能の減少によって肝への転移も減少した。しかし、ベクターの導入が直接的に腫瘍の転移抑制をしているとは結論されていない（Witty, J. P., Matrisian, L. M. et al., Cancer Res., 54, 4805-4812 (1994)）。

更に、別のグループにより同様に cDNA 全長を逆方向に組み込んだベクターを作成し、これを大腸がん細胞株に導入して、がんの浸潤におけるマトリライシンの役割について検討された。インビトロ試験においてはベクターを組み込んだ大腸がん細胞はベクターの導入により、その浸潤能が約 1 / 2 に減少したが、転移について明確な記載がない（Yamamoto H., Imai K., et al., Int. J. Cancer, 61, 218-222 (1995)）。

又、インビトロの実験系に於いては、マトリライシン発現ヒト直腸がん細胞株 CaR-1 の浸潤が AUG 開始コドンを含む領域を認識するマトリライシンアンチセンスオリゴヌクレオチドによって濃度依存性の抑制を受けることが示されてはいるが（嶋田紘ら、日消外会誌、29、8

78-883(1996))、インビボにおいてはマトリライシンアンチセンスオリゴヌクレオチドが転移抑制効果を有するか否かについては明らかにされていない。

更に、インビトロでの浸潤アッセイとインビボでの転移能との間には関連が見られないという報告もなされた (Simon, N. et al., *Invasion Metastasis*, 12, 156-167(1992))。

発明の開示

そこで、本発明者は、アンチセンス技術を利用して、マトリライシンの発現を特異的に阻害し、インビボにおいて、がんに対する転移抑制活性を有するような物質を見出すべく研究を重ね、本発明を完成するに至ったのである。

即ち、本発明の課題は、特にインビボにおいて、がんの転移を抑制し得るマトリライシンのアンチセンス化合物およびこれを含む医薬組成物を提供することである。

本発明は、ヒトマトリライシンをコードする遺伝子の少なくとも一部とハイブリダイズするアンチセンス化合物に係わる。

本発明は又、ヒトマトリライシンをコードする遺伝子の少なくとも一部に相補的な配列を含むアンチセンス化合物に係わる。

本発明は好ましくは、配列番号1 (Core領域)、配列番号2 (Capping Site)、又は、配列番号3 (AUG近傍)のいずれかの少なくとも一部とハイブリダイズするアンチセンス化合物に係わる。

本発明は特に、かかるアンチセンス化合物の中でも、上記部分配列の少なくとも一部に相補的な配列を含むアンチセンス化合物に係わる。

前述のように、嶋田紘らのAUG近傍の領域の遺伝子に対するアンチセンス化合物はインビトロの実験では株化癌細胞の浸潤を抑制する効果を示したが、癌転移モデルを用いたインビボの実験では明確な効果を示すことができなかった。

そこで、本発明のアンチセンス化合物としては、インビボの実験で癌転移抑制効果を有するアンチセンス化合物が好ましい。

本発明はさらに好ましくは、ヒトマトリライシンをコードする遺伝子の部分配列である、配列番号1の少なくとも一部に相補的な配列を含むアンチセンス化合物に係わり、特に好ましくは、配列番号1の配列中の下線部の配列に相補的な配列番号4で示されるアンチセンス化合物に係わる。

本発明のアンチセンス化合物は、ヒトマトリライシン遺伝子の転写または翻訳を抑制し、ヒトマトリライシンの発現を抑制しうるものである。

さらに本発明のアンチセンス化合物は、インビボ系において、がんの転移を有意に抑制し得るものである。

本発明は好ましくは、ヌクレオチド間の結合基の少なくとも1つがイオウ原子を含むアンチセンス化合物である。

本発明のアンチセンス化合物には、オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド誘導体、及びペプチド核酸に代表されるようなオリゴヌクレオチド誘導体以外の物質が含まれる。

本明細書中で、「ヒトマトリライシンをコードする遺伝子」とは、染色体DNAまたはその転写物（mRNAおよびその前駆体）を意味し、ヒトマトリライシンのアミノ酸配列を規定している構造遺伝子に加えて

、構造遺伝子の途中に存在する介在配列（イントロン）、ヒトマトリライシンの発現に関与する、構造遺伝子上流の塩基配列（プロモーターやオペレーターなど）及び構造遺伝子下流の塩基配列等も包含するものである。かかる遺伝子の部分配列としては、例えば配列番号１～３で表されるものが挙げられる。

又、本明細書中で「ハイブリダイズする」とは、染色体DNAもしくはmRNAに対する特異的結合を形成することをいう。ハイブリダイズの強さとしては0.15Mリン酸緩衝液で、35℃以上のT_m値を持つものであればよく、45℃以上のT_m値を持つものであれば好ましく、さらに55℃以上のT_m値を持つものがより好ましい。

ハイブリダイズする際に見られる結合は主として相補的結合であるが、標的配列に対する特異的結合を形成するものであればいずれの結合様式であってもよい。つまり、本発明のアンチセンス化合物は必ずしも標的配列に対し、以下に述べるような相補的配列を完全に持つ必要はなく、イノシンや3-ニトロピロールに代表されるユニバーサルベースを含んでいてもよいし、その一部に相補的でない塩基もしくは配列を含んでいてもよい。

また、本発明のアンチセンス化合物はヒトマトリライシンをコードする遺伝子のいかなる部分にWatson Crick型、もしくはHoogsteen 型またはその両方の二重鎖もしくは三重鎖を形成してもよい。

本発明のアンチセンス化合物は、ヒトマトリライシンをコードする遺伝子の一部に相補的な配列を含むオリゴヌクレオチドであるのが好ましい。

「相補的な配列」とは、DNAやRNAの塩基配列に対して塩基特異

的な相補的塩基対を形成するような塩基対をいう。一般的にはC（シトシン）とG（グアニン）の間、T（チミン）とA（アデニン）の間、およびU（ウラシル）とA（アデニン）との間で相補的塩基対が形成される。

一般的には、10塩基以上の塩基を含む塩基配列であれば、特異的配列と考えられている。したがって、本発明のオリゴヌクレオチドは10塩基以上からなる塩基配列を含むものであれば、ヒトマトリライシンをコードする遺伝子に特異的にハイブリダイズすることが期待される。

一方、オリゴヌクレオチドを細胞内に取り込ませるには、その長さが余り長すぎても不適當である。本発明のオリゴヌクレオチドはいかなる長さのものでもよいが、本発明のオリゴヌクレオチドを細胞内に取り込ませ、ヒトマトリライシンの発現を有効に抑制する為には50塩基以下の長さが適當である。

従って本発明のオリゴヌクレオチドは、ヒトマトリライシンをコードする遺伝子にハイブリダイズし、10塩基以上50塩基以下のものが好ましく、更に、10塩基以上30塩基以下、特に15塩基以上25塩基以下の塩基数からなるものが好ましい。

アンチセンス技術の進歩とともに、オリゴヌクレオチドの効果を高めることを目的として様々な誘導体が見いだされてきた。現在、目的のDNAやmRNAとの結合力、組織選択性、細胞透過性、ヌクレアーゼ耐性、細胞内安定性の高い様々なオリゴヌクレオチド誘導体を得られている。従って、本発明のオリゴヌクレオチドには、天然には存在しないような、塩基、糖、リン酸、バックボーン構造からなるものも含めて、あらゆる種類の誘導体が含まれる。

本発明に含まれるオリゴヌクレオチド誘導体の例としては、バックボーン構造として、その全部または一部にフォスフォジエステル (phosphodiester) 結合、フォスフォロチオエート (phosphorothioate) 結合、メチルフォスフォネート (methylphosphonate) 結合、フォスフォロアミデート (phosphoroamidate) 結合、フォスフォロジチオエート (phosphorodithioate) 結合、モルホリノ基を有するもの等 (東海林洋子 等、癌と化学療法、20巻、1899-1907頁、(1993年)) が挙げられる。

又、デオキシリボヌクレオチドグアニジン (DNG) (Robert P等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、92巻、6097頁、(1995年))、糖の2'位が他の原子あるいは置換基に置換されたもの、或いは α -リボース等の糖部分を修飾したものも誘導体の例として挙げられる (Bertrand JR. Biochem. Biophys. Res. Commun. 164巻、311頁、(1989年))。

更に、糖部分が他の物質に置換されたもの、一部の塩基がイノシンやユニバーサル塩基 (A、T、C、Gのいずれにでも結合する塩基) に置換されたもの、オリゴヌクレオチドの5'末端もしくは3'末端もしくは内部にコレステロールやアクリジン、ポリ-レーリジン、ソラレン (psoralen)、長鎖アルキル等が結合したもの (G. Degols 等、Nucleic Acid Research. 17巻、9341頁、(1989年) ; A. McConaghie等、J. Med. Chem. 38巻、3488頁、(1993年) ; G. Godard 等 Eur. J. Biochem. 232巻、404頁、(1995年)) 等のオリゴヌクレオチド誘導体も本発明に含まれる。

本発明のアンチセンス化合物は、特許請求の範囲に記載した要件を満

たすものであれば、例示したオリゴヌクレオチド誘導体をはじめとしていかなる物質であってもよい。しかしながら、アンチセンス化合物は、ヌクレアーゼ耐性、組織選択性、細胞透過性、結合力の少なくとも1つが高められたオリゴヌクレオチド誘導体であることが好ましい。特に、ヌクレオチド間の結合基の少なくとも1つがイオウ原子を含むオリゴヌクレオチド誘導体が好ましく、フォスフォロチオエート結合をバックボーン構造として有するオリゴヌクレオチド誘導体がより好ましい。

以下に、本発明のアンチセンス化合物の製造方法を説明する。

本発明のアンチセンス化合物は当業者であれば公知方法で容易に製造することができる（例えば、オリゴヌクレオチドやその誘導体は、S. Agrawal等 Protocol for oligonucleotides and Analogs. Method in Molecular Biology Series 20巻、Humana Press, S. Agrawal等 Antisense Research and Development 4巻、185頁、（1994年））。

天然のDNAやRNAであれば、化学合成機を使用して合成したり、ヒトマトリライシンをコードする遺伝子を鋳型としてPCR法により本発明のオリゴヌクレオチドを得ることができる。また、メチルフォスフォネート型やフォスフォロチオエート型等の中には、化学合成機（たとえば、パーキンエルマージャパン（株）製、394型）を使用して合成できるものもある。この場合には、化学合成機に添付されたマニュアルに従って操作を行い、得られた合成産物を逆相クロマトグラフィー等を用いたHPLC法により精製することによっても、目的のオリゴヌクレオチド誘導体を得ることができる。

次に本発明のアンチセンス化合物の利用方法について説明する。

本発明のアンチセンス化合物を診断用のプローブとして使用する場合には、それらを、公知の方法に従い、ラジオアイソトープや、酵素、蛍光物質、発光物質等で標識する。次に、ヒトにおけるマトリライシンの発現を調べたい患者の細胞からDNAもしくはmRNAを公知方法で調製し、これを被検物質として、標識プローブを加えて反応させた後、洗浄して未反応の標識プローブを除去する。被検物質中にヒトマトリライシンDNAもしくはRNAが含まれていれば、標識プローブはそれらと結合する。結合形成の有無は、標識した酵素、蛍光物質、発光物質、あるいは放射性同位元素等により発光、蛍光、放射能等を指標として知ることができる。

したがって、本発明のアンチセンス化合物は診断用プローブとして、マトリライシンを介する疾患、具体的にはがんの転移の診断に利用することができる。また、がんの程度や治療方法を決定するための診断にも使用することができる。

本発明のアンチセンス化合物はインビボでのがんの転移を抑制する効果を有しているので、本発明は更に、かかるアンチセンス化合物を含む医薬組成物、特にがん転移抑制剤としての医薬組成物に係わる。

本発明の医薬品の投与する対象はがんであれば特に限定しない。例えば大腸がん、前立腺がん、脳腫瘍、及びリンフーマ等であり、より好ましくは大腸がん、特にその肝転移の予防あるいは治療に用いることができる。

本発明の医薬品を使用する場合には、医薬品として使用するのに適した純度のものを、薬理学的に許容されうる使用方法で使用する 것이好ましい。

本発明のアンチセンス化合物は、それらを直接適当な溶媒に溶解もしくは懸濁して使用してもよいし、リポソーム中に封入したり、適当なベクターに組み込んだ形にして使用してもよい。また、必要に応じて、本発明のアンチセンス化合物に薬学的に許容され得る担体を添加し、注射剤、錠剤、カプセル剤、点眼剤、クリーム剤、座剤、噴霧剤、及びパップ剤等の適当な剤型にして使用してもよい。薬学的に許容し得る担体には、当業者には周知の溶媒、基剤、安定化剤、防腐剤、溶解剤、賦形剤、及び緩衝剤等が含まれる。

本発明のアンチセンス化合物は、上述のような剤型とした場合、患者の年齢、性別、疾患の種類、程度等に応じて、その投与方法、その投与量を設定して使用することができる。すなわち、マトリライシンの発現を抑制し、病態を改善するのに適した量を、経口投与または非経口投与する。例えば、連続的にあるいは1日あたり1回若しくは数回に分けて、0.001～2000mg/kgが投与される。静脈注射の場合は0.01～100mg/kgが好ましく、0.1～50mg/kgが特に好ましい。また、本発明のアンチセンス化合物は上記投与量においては十分に安全である。

経口投与には舌下投与を含む。非経口投与は、吸入、経皮投与、点眼、腔内投与、関節内投与、直腸投与、動脈内投与、静脈内投与、局所投与、筋肉内投与、皮下投与、及び腹腔内投与等から適当な方法を選んで投与すればよい。

図面の簡単な説明

図1は、マトリライシンのmRNAの構造、並びに配列番号1、配列

番号 2、及び配列番号 3 の塩基配列、並びに本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドである配列番号 4 の塩基配列を示す。

図 2 は、インビトロ系に於ける本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド A S - 1 による浸潤抑制効果を表す。平均値を標準偏差と共に示す。

図 3 は、インビボ系に於ける本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド A S - 1 による肝臓への転移抑制効果を表す。平均値を標準偏差と共に示す。尚、図中の記号は、コントロール P B S (□)、コントロールオリゴヌクレオチド C L - 1 (△) 及びアンチセンスオリゴヌクレオチド A S - 1 (○) である。

図 4 は、インビボ系に於ける本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド A S - 1 による肝臓への転移抑制効果の用量依存性を表す。平均値を標準偏差と共に示す。

発明を実施するための最良の形態

以下、実施例を参照しながら本発明を詳細に説明するが、該実施例は本発明の範囲を何等限定するものではない。

実施例 1

(1) アンチセンスフォスフォロチオエートオリゴヌクレオチドの製造

マトリライシンに特異的なアンチセンスオリゴヌクレオチドとコントロールオリゴヌクレオチドは、コンピュータプログラム HYB simulator (Advanced Gene Computing Technologies, Irvine, CA) を用いて設

計した。

かかるオリゴヌクレオチドの設計に際しては、融点として35℃を有する可能性のある全ての配列を、目標となるマトリライシンmRNAのあらゆる部位から抽出した。

その後、このようにして抽出した各配列の特異性（GenBank データベースにある全配列に対するクロス-ハイブリダイゼーションの度合）及び該ヌクレオチド配列とマトリライシンmRNA両者に於ける2次構造形成能をコンピュータで分析した（Mitsuhashi M. et al., Nature 367: 759-761, (1994); Hyndman D. et al., Biotechniques 20: 1090-1097, (1996)）。

その結果、特異性が高く2次構造形成能が低い配列として、マトリライシンmRNAのコア（Core）領域にハイブリダイズする15merオリゴヌクレオチドAS-1（配列番号4）が選ばれた。

AS-1 : GTATATGATACGATC

コントロール配列としては、上記アンチセンス配列と同一の長さと同様のGC含量を有するようにアデニン及びチミン残基でランダムに置換して得られた15merオリゴヌクレオチドCL-1を使用した。

CL-1 : GTATTAGTATCGAAC（配列番号5）

これらのオリゴヌクレオチドは、自動DNA合成装置（Applied Biosystems Model 380B, Foster City CA）を用いて合成した。

これらの合成したオリゴヌクレオチドはその都度調製したDulbecco's リン酸塩緩衝溶液（PBS）（Hyclone, Logan, UT）中に溶解した。

（2）細胞株及び培養条件

ヒト直腸がん細胞株CaR-1及びSW480はJCRB 細胞バン

ク（東京）から入手した。これらの細胞株は、10%牛胎児血清（Gibco BRL, Gaithersburg, MA）、100単位/mlペニシリンG、及び0.1mg/ml硫酸ストレプトマイシン添加のDMEM培地（Gibco BRL）中で、37℃、5%CO₂及び95%空気の湿気状態で培養した。初期細胞濃度 2×10^5 個/mlで3～4日毎に植継いだ。培養プレート及び培養ディッシュは住友ベークライト（東京）製を用いた。

（3）放射標識（ラベル）オリゴヌクレオチドの細胞内取込み

上記で作成した各オリゴヌクレオチドを、バクテリオファージT4ポリヌクレオチドキナーゼ（Gibco BRL）を使用して[γ -³²P]ATP（3000Ci/mmol）でラベルした。

放射標識されたオリゴヌクレオチドは液体クロマトグラフィーを用いてフリーの[γ -³²P]を分離することによって精製した。

上記細胞株を96穴プレート中の血清無添加DMEM培地に植え込み、各穴に放射標識した各オリゴヌクレオチド1ngを添加した。それぞれの時間経過後に、細胞を洗浄し、半自動細胞ハーベスター（PHD model 290: Cambridge Technology）を用いてガラス繊維フィルター（Glass Fiber Strips 240-1: Cambridge Technology, Watertown, MA）上に採取した。取り込まれた³²P標識オリゴヌクレオチドの量は液体シンチレーションカウンター（LS6000ic）（Beckman Industries, Fullerton, CA）を用いて測定した。

その結果、取込み量は24時間頃迄は直接的に増加し、約48時間経過するとほぼ平衡状態に達することが判った。

添加した量の18%（24時間後）及び21%（48時間後）が細胞に取り込まれていた。また、AS-1及びCL-1の間に取込みの速度

及び効率に関して顕著な差異は見られなかった。

(4) オリゴヌクレオチドの細胞内蓄積

フオスフォロチオエートオリゴヌクレオチド A S - 1 及び C L - 1 をフルオロセインイソチオシアネート (F I T C) を用いて (Leonetti J P. et al., Proc Natl Acad Sci USA 88: 2702-2706, (1991)) ラベルした。

細胞株 (C a R - 1) を 2 4 穴プレート中の血清無添加 D M E M 培地に植え込み、10 μ M のフルオロセイン標識オリゴヌクレオチドと共に 2 4 時間インキュベートした。細胞を十分に洗浄して細胞外部の該オリゴヌクレオチドを除去し、蛍光共焦点顕微鏡 (ニコン) 下で観察した。

その結果、A S - 1 及び C L - 1 の両者ともに 2 4 時間後には細胞の核及び細胞質内に分布していることが判った。

(5) C a R - 1 細胞株に於けるマトリライシン mRNA の発現に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドの効果

2 4 穴プレートの各ウェル中の血清無添加 D M E M 培地、A S - 1 又は C L - 1 オリゴヌクレオチドを 10 μ M 含む同培地の各々 1 ml に、50,000 個/穴の割合で細胞株を植え込み、2 4 時間インキュベートして処理した。

次に、酸グアニジウムチオシアネート-フェノールクロロホルム法を用いて全細胞 R N A を抽出した。ビオチン化オリゴ-d T 及びストレプトアビジン常磁性粒子 (Promega, Madison, WI) を用いて全 R N A を捕捉した。こうして単離した m R N A から M - M L V 逆転写酵素 (Gibco BRL) を用いてランダムにプライマー化した c D N A を調製した後、P C R 増幅処理を施した (Perkin-Elmer/Cetus, Norwalk, CT)。

用いたプライマーペアは以下の通りである。

マトリライシンセンスプライマー：5'-GTGACCGCGACTTTTCAAAGC-3'（配列番号6）

マトリライシンアンチセンスプライマー：5'-CGTTGCGGGGACTGGATTATCAG-3'（配列番号7）

β -アクチンセンスプライマー：5'-CTTCGCGGGGCGACGATGC-3'（配列番号8）

β -アクチンアンチセンスプライマー：5'-CGTACATGGCTGGGGTGTTG-3'（配列番号9）

PCR増幅は、94℃での変性（1分間）、55℃でのアニーリング（1.5分間）及び72℃でのポリメラーゼ反応（4分間）のサイクルを、それぞれ35サイクル（マトリライシン）及び25サイクル（ β -アクチン）繰り返した。得られたPCR産物を1.2%アガロースゲル中で電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色した。

その結果、CaR-1細胞株は通常の条件下では内因性マトリライシンmRNAを発現するが、AS-1オリゴヌクレオチドで処理した場合にはその発現量が顕著に低下することが判明した。

これに対して、CL-1ヌクレオチドで処理した場合には、このような発現抑制効果は観察されなかった。

デンシトメトリー分析によれば、AS-1によってマトリライシンmRNAの発現の92%が抑制されていた。

尚、AS-1又はCL-1のいずれのオリゴヌクレオチドも β -アクチンmRNAの発現レベルに影響は与えていなかった。

（6）CaR-1細胞株に於けるマトリライシン蛋白質発現に対する

アンチセンスオリゴヌクレオチドの効果

上記インキュベーション（４８時間）後に得られた増殖培地を１５，０００×ｇで３０分間遠心分離した。これに８０％飽和硫酸アンモニウムを添加し、蛋白質を沈殿させ、これを１５，０００×ｇ、３０分間の遠心分離で回収した。得られた蛋白質を１０％ＳＤＳ－ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけ、その後ニトロセルロース膜（Bio-Rad, Hercules, CA)に写しとった。

この膜を３％ゼラチン／ＴＢＳ（２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、ｐＨ７．６、０．９％塩化ナトリウム）で１０分間、室温にてブロック処理した。

その後、１％ゼラチン／ＴＢＳで１：１０に希釈したウサギ抗ヒトマトリライシンポリクローナル抗体（Miyazaki K, et al. Cancer Res 50, 7758-7765(1990))と２時間反応させ、更に、同様に希釈したアルカリフォスファターゼ結合ヤギ抗ウサギＩｇＧ抗体（Sigma）と１時間反応させた。

アルカリフォスファターゼ結合基質キット（Bio-Rad）を用いて製品プロトコールに従い、発色反応を行った。

その結果、マトリライシンの前駆体（２９Ｋ）、中間型（２３Ｋ）及び活性型（２０Ｋ）の３種類の蛋白質が、未処理ＣａＲ－１細胞株の増殖培地中に見出された。

ところが、ＡＳ－１オリゴヌクレオチドで処理することにより、マトリライシン活性型は現れなくなり、その他の型の発現も顕著に減少することが判明した。デンストメーターによる分析でマトリライシン蛋白質全量の６４％が発現を抑制されたことが判明した。一方、ＣＬ－１オリゴヌクレオチドによる処理ではこのような抑制結果は示されなかった。

インビトロ浸潤アッセイ

C a R - 1 細胞 (5×10^3 個) を M I C S チャンバー内のマトリゲル (再構成基底膜) 被膜フィルター ($8 \mu\text{m}$ 細孔) 上に植え込み、48 時間インキュベーションした。この際、種々の濃度 (2.5 及び $10 \mu\text{M}$) のオリゴヌクレオチドを添加した。

フィルター内に完全に浸潤した細胞をメタノールで固定し、ギムザ染色し、顕微鏡で観察し、浸潤細胞数を計測した。フィルターに浸潤した細胞数を上部ウェル上の細胞数で除して、浸潤細胞の割合 (%) を算出した。

その結果、 $10 \mu\text{M}$ の A S - 1 で処理した場合に最大の効果が認められ、未処理の細胞と較べて、浸潤能が半減した (図 2)。

A S - 1 による効果は $2 \mu\text{M}$ から $10 \mu\text{M}$ の間で用量依存的であり、一方、C L - 1 は全ての濃度でこのような効果を示さなかった。

また、陰性コントロールとしてマトリライシンを生産しないヒト直腸がん細胞である S W 4 8 0 を用いて同様のアッセイを行った。この結果、A S - 1 又は C L - 1 のいずれのヌクレオチドもこの細胞の浸潤能に影響を及ぼすことはなかった。

以上のアッセイに於ける培養期間中、細胞増殖速度はオリゴヌクレオチドの存在の有無にかかわらず、ほぼ同一であった。

実施例 2

W i D r 細胞株に於けるマトリライシン蛋白質発現に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドの効果

ヒト大腸がん細胞株である W i D r はマトリライシンを非常に高いレ

ベルで生産することが知られており、更に本発明者等によって、ゼラチナーゼ、間質型コラゲナーゼ及びストロムライシンのいずれも検出可能な量は分泌していないことが確認されている。WiDrはJCRB細胞バンク（東京）から入手した。

この細胞株を、10%牛胎児血清（Gibco BRL）、100単位/mlペニシリンG、及び1mg/ml硫酸ストレプトマイシン添加のDMEM/F12培地（Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD, USA）0.5mlを含有する24穴プレート（住友ベークライト（東京）製）の各ウェル中に 5×10^4 個植え込み、37℃、5%CO₂及び95%空気の湿気状態下で6時間培養した。その後二回洗浄し、血清無添加培地中で2日間培養した。

実施例1（1）で作成した15merアンチセンスオリゴヌクレオチドAS-1（1mM）又は15merコントロールオリゴヌクレオチドCL-1（1mM）を含むPBS各5μl並びにオリゴヌクレオチドを含有しないPBS5μlを、8時間毎に添加しながら2日間培養した。その後、それぞれ2穴からの増殖培地を合わせ、以下、実施例1に記載したような手順に従ってウエスタンブロット処理にかけた。

デンストメーターによる分析によって、AS-1オリゴヌクレオチドで処理することにより、マトリライシン蛋白質全量の発現の約40～80%が抑制されたことが判明した。一方、CL-1オリゴヌクレオチドによる処理ではこのような抑制効果は示されなかった。

又、WiDrの増殖自体にはAS-1オリゴヌクレオチド又はCL-1オリゴヌクレオチドのいずれも全く影響を与えることはなかった。

実施例 3

WiDr 細胞株に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドのインビボでの効果

WiDr 細胞株を 10% 牛胎児血清 (Gibco BRL)、100 単位/ml ペニシリン G、及び 1 mg/ml 硫酸ストレプトマイシン添加の DMEM/F12 培地 (Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD, USA) 中で 37℃、5% CO₂ 及び 95% 空気の湿気状態で培養した。これをトリプシン (0.25% トリプシン/0.02% EDTA) 処理し、最終濃度 1×10^8 個/ml となるように同培地中に懸濁した。

BALB/c nu/nu ノドマウスを 2.5% アベルチン溶液で麻酔し、無菌的に左脇腹を切開して脾臓を一時的に体外に露出させ、1 ml の注射器 (27 ゲージ針) を使用して 5×10^6 個の WiDr を含有する上記懸濁液 50 μ l をこの露出させた脾臓に注入した。

又、実施例 1 で作成した 15mer アンチセンスオリゴヌクレオチド AS-1 (120 μ g) 又は 15mer コントロールオリゴヌクレオチド CL-1 (120 μ g) を含む PBS 並びにこれらのオリゴヌクレオチドを含有しない PBS の各 0.25 ml を上記脾臓処理の 1 日前から 10 日後までの間毎日腹腔内に注入した。

それぞれ 11、28 及び 42 日後にマウスを屠殺して肝臓と脾臓を摘出し、それぞれにできた腫瘍の数を計測した。その結果を図 3 に示す。

図 3 に示された結果から明らかなように、コントロール PBS 又はコントロールオリゴヌクレオチド CL-1 を注入したマウスの場合には、10 日後に肝転移巣の腫瘍が現れ、42 日後には顕著な増加が見られた。

これに対して、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドA S - 1 を注入したマウスの場合にはこれらのマウスと較べて実験の全期間にわたって、肝転移巣の腫瘍の数が顕著に減少していることが判る。コントロールP B S を注入した対象群に対して、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドA S - 1 を注入したマウスの肝転移巣の腫瘍の数は、1 1、2 8 及び4 2 日後にそれぞれ、1 3 %、2 3 及び2 9 %である。

次に、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドA S - 1 による上記抑制効果の用量依存性を確認した。

各群5匹のマウスを使用して、上記と同様に各量のアンチセンスオリゴヌクレオチドA S - 1 で処理し、W i D r 細胞の注入4 2 日後に屠殺して肝臓にできた腫瘍の数を計測した。その結果を図4に示す。

1. $2 \mu\text{g}$ / 個体の投与では肝転移巣の腫瘍の形成に関して何等の影響も見られない。しかしながら、 $12 \mu\text{g}$ / 個体を投与した場合には抑制効果が観察され、 $120 \mu\text{g}$ / 個体を投与すると肝転移巣の腫瘍の数はコントロールP B S を注入した対象群に対して約3 0 %に減少した。

尚、全てのマウスでW i D r 細胞が注入された脾原発巣に腫瘍の形成が見られた。その大きさには、コントロールP B S、コントロールオリゴヌクレオチドC L - 1、及びアンチセンスオリゴヌクレオチドA S - 1 の投与において、有意な差は認められなかった。このことより、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドA S - 1 は腫瘍の増殖には影響を与えないものと思われる。

更に、肝転移巣の腫瘍の大きさに関しても各群で有意な差異は見られなかった。

実施例 4

術後投与モデルでのアンチセンスオリゴヌクレオチドの効果

実施例 3 と同様な手順で脾臓内に W i D r 細胞を注入したマウスについて、脾臓への注入から 24 時間後に脾臓摘出術を行い、実施例 1 で作成した 15 m e r アンチセンスオリゴヌクレオチド A S - 1 又は 15 m e r コントロールオリゴヌクレオチド C L - 1 を含む P B S を $10 \mu g /$ マウス、並びにこれらのオリゴヌクレオチドを含有しない P B S を、翌日から 10 日間連続して腹腔内に注入し、4 週間後に屠殺したのち肝転移巣を観察した。

4 週間後の肝転移結節数は P B S 群 : 7 ± 0.56 個、コントロールオリゴヌクレオチド群 : 16.3 ± 4.8 個であったがアンチセンスオリゴヌクレオチド群 : 0 個であり、アンチセンスオリゴヌクレオチドによる転移抑制効果が認められた。

産業上の利用可能性

本発明のアンチセンス化合物は、実験動物を用いたインビボ系に於いて、実際に大腸がん細胞の肝転移を有意に抑制することが効果を有し、医薬としての有用なものであることが確認された。

配列表

配列番号：1

配列の長さ：55

配列の型：核酸

鎖の数：2本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

起源

生物名：human

配列

TCCAAAGTGG TCACCTACAG GATCGTATCA TATACTCGAG ACTTACCGCA TATTA 55

配列番号：2

配列の長さ：21

配列の型：核酸

鎖の数：2本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

起源

生物名：human

配列

AAATCAACCA TAGGTCCAAG A 21

配列番号：3

配列の長さ：36

配列の型：核酸

鎖の数：2本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：c D N A t o m R N A

起源

生物名：h u m a n

配列

TCTGGACGGC AGCTATGCCA CTCACCGTGC TGTGTG 36

配列番号：4

配列の長さ：1 5

配列の型：核酸

鎖の数：1 本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成D N A

配列

GTATATGATA CGATC 15

配列番号：5

配列の長さ：1 5

配列の型：核酸

鎖の数：1 本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成D N A

配列

GTATTAGTAT CGAAC 15

配列番号：6

配列の長さ：2 1

配列の型：核酸

鎖の数：1 本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GTGACCGCGA CTTTCAAAG C 21

配列番号：7

配列の長さ：22

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CGTTGCGGGA CTGGATTATC AG 22

配列番号：8

配列の長さ：18

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CTTCGCGGGC GACGATGC 18

配列番号：9

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

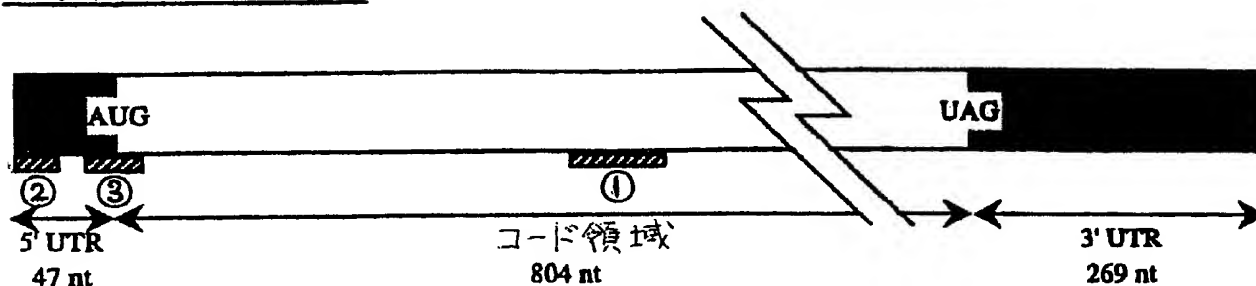
配列

CGTACATGGC TGGGGTGTG 20

請求の範囲

1. ヒトマトリライシンをコードする遺伝子の部分配列である配列番号 1 (Core領域)、配列番号 2 (Capping Site)、又は、配列番号 3 (AUG 近傍) のいずれかの少なくとも一部とハイブリダイズするアンチセンス化合物。
2. ヒトマトリライシンをコードする遺伝子の部分配列である配列番号 1 (Core領域)、配列番号 2 (Capping Site)、又は、配列番号 3 (AUG 近傍) のいずれかの少なくとも一部に相補的な配列を含むオリゴヌクレオチドである、請求項 1 に記載のアンチセンス化合物。
3. 配列番号 1 の塩基配列の少なくとも一部に相補的な配列を含む請求項 2 に記載のアンチセンス化合物。
4. ヒトマトリライシンの発現を抑制しうる請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載のアンチセンス化合物。
5. 塩基数が 10 ないし 50 である請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載のアンチセンス化合物。
6. 塩基数が 10 ないし 30 である請求項 5 に記載のアンチセンス化合物。
7. ヌクレオチド間の結合基の少なくとも 1 つがイオウ原子を含む請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載のアンチセンス化合物。
8. 配列番号 4 で示されるアンチセンス化合物。
9. 請求項 1 ～ 8 のいずれかに記載のアンチセンス化合物を含む医薬組成物。
10. がん転移抑制剤である請求項 9 に記載の医薬組成物。

第 1 図

マトリライシン mRNA

コア領域 (配列番号 1)

TCC AAA GTG GTC ACC TAC AGG ATC GTA TCA TAT ACT CGA GAC
TTA CCG CAT ATT A

ギャップ形成部位 (配列番号 2)

AAA TCA ACC ATA GGT CCA AGA

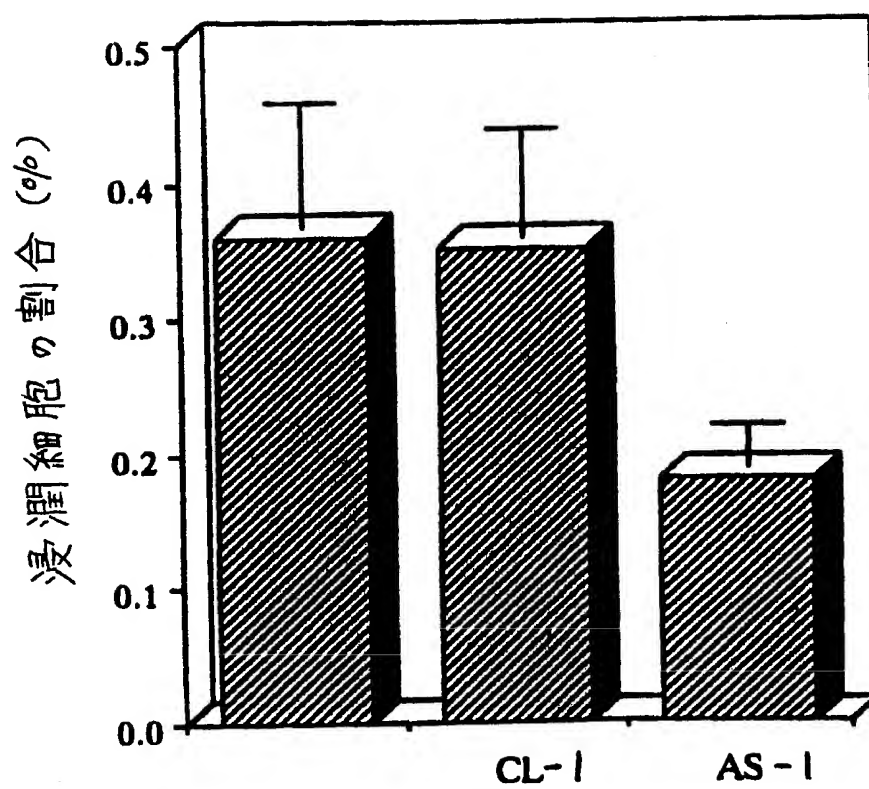
AUG近傍 (配列番号 3)

TCT GGA CGG CAG CTA TGC GAC TCA CCG TGC TGT GTG

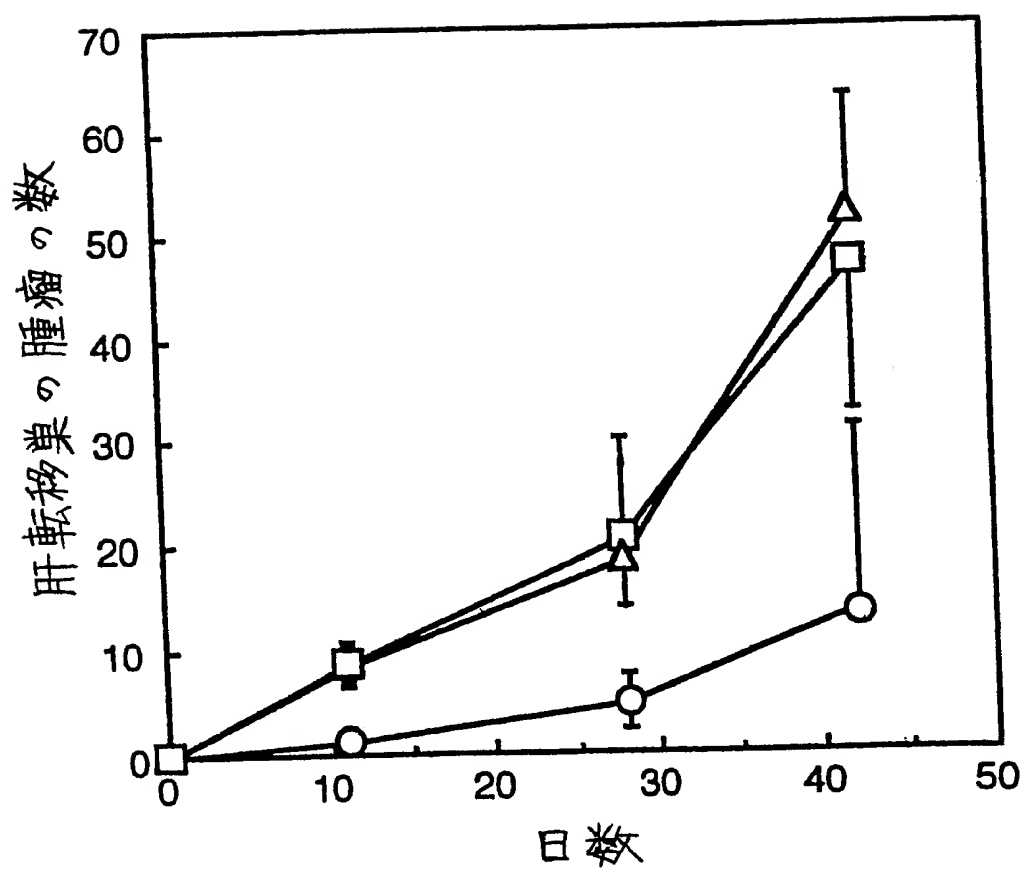
AS-1 (配列番号 4)

GTATATGATACGATC

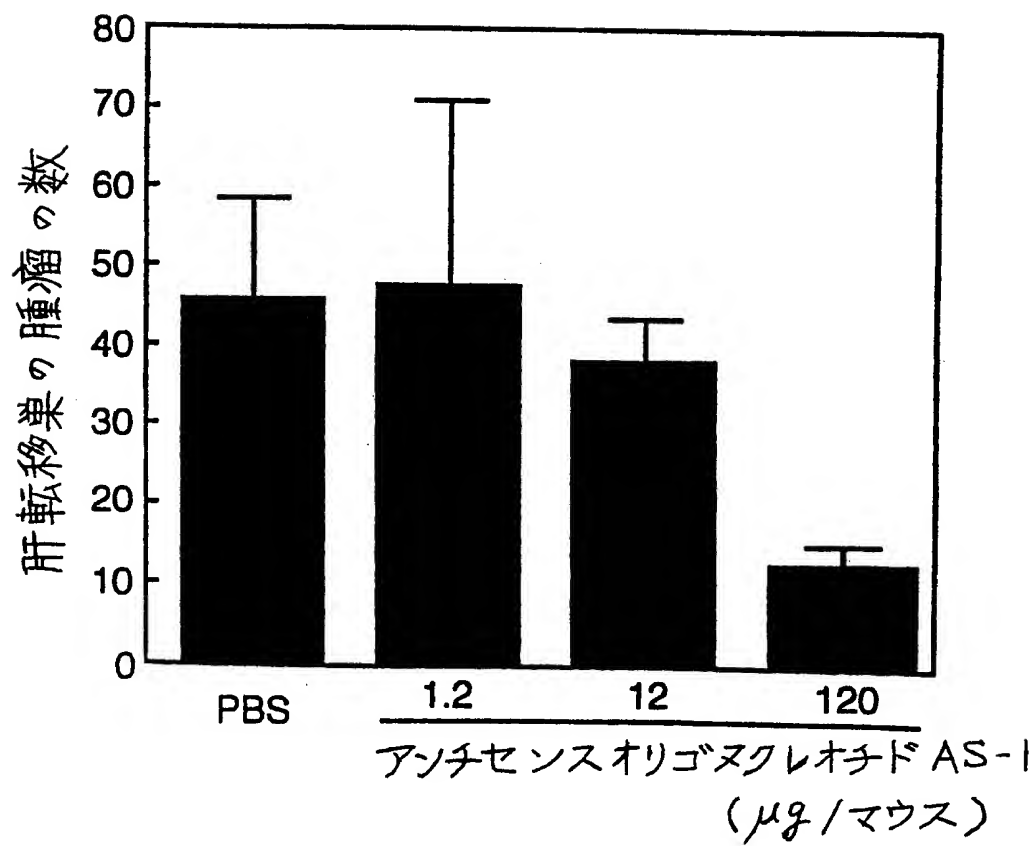
第 2 図



第3図



第4図



Statement concerning non-prejudicial disclosure or exception to lack of novelty.

「不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する陳述」

開示の日	平成9年6月1日
(Date of Disclosure)	(01.06.97)
開示の場所	日本
(Place of Disclosure)	(Japan)
開示の種類	文献発表
(Kind of Disclosure)	(Publication)
日本消化器外科学会雑誌 第30巻第6号119 (1189) 頁	
The Japanese Journal of Gastroenterological Surgery,	
Vol. 30 No. 6 p. 119(1189)	

開示の日	平成9年8月25日
(Date of Disclosure)	(25.08.97)
開示の場所	日本
(Place of Disclosure)	(Japan)
開示の種類	文献発表
(Kind of Disclosure)	(Publication)
日本癌学会総会記事 第56回総会(京都) 平成9年9月	
JAPANESE JOURNAL OF CANCER RESEARCH,	
56th Annual Meeting, September, 1997 Kyoto	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/02327

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁶ C12N15/11, A61K31/70, A61K48/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁶ C12N15/00-15/90, A61K31/70, A61K48/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA (STN), REGISTRY (STN), WPI (DIALOG), BIOSYS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X /A	Biochem. J. <u>253</u> (1988) Daniele MULLER et al., "The collagenase gene family in humans consists of at least four members" p.187-193	1-7, 9-10 /8
X /A	Biochem. J. <u>285</u> (1992) Hans-Peter MARTI et al., "Molecular characterization of a low-molecular-mass matrix metallo-proteinase secreted by glomerular mesangial cells as PUMP-1" p.899-905	1-7, 9-10 /8
X /A	The Journal of Biological Chemistry <u>269</u> (1994) Mireille Gaire et al., "Structure and Expression of the Human Gene for the Matrix Metalloproteinase Matrilysin" p.2032-2040	1-7, 9-10 /8

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
August 4, 1998 (04. 08. 98)

Date of mailing of the international search report
August 18, 1998 (18. 08. 98)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁶ C12N15/11, A61K31/70, A61K48/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁶ C12N15/00-15/90, A61K31/70, A61K48/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA (STN), REGISTRY (STN), WPI (DIALOG), BIOSYS (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X /A	Biochem. J. 253 (1988) Daniele MULLER et al. 「The collagenase gene family in humans consists of at least four members」 p.187-193	1-7, 9-10 /8
X /A	Biochem. J. 285 (1992) Hans-Peter MARTI et al. 「Molecular characterization of a low-molecular-mass matrix metallo-proteinase secreted by glomerular mesangial cells as PUMP-1」 p. 899-905	1-7, 9-10 /8

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

04.08.98

国際調査報告の発送日

18.08.98

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

小暮 道明



4 B

9637

電話番号 03-3581-1101 内線 3449

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X /A	The Journal of Biological Chemistry 269 (1994) Mireille Gaire et al. 「Structure and Expression of the Human Gene for the Matrix Metalloproteinase Matrilysin」 p. 2032-2040	1-7, 9-10 /8